

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-173192

(43)Date of publication of application : 09.07.1996

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

(21)Application number : 06-335000

(71)Applicant : HAMAMATSU PHOTONICS KK

(22)Date of filing : 20.12.1994

(72)Inventor : HOSOI SHIGERU
HIYOSHI MAKIKO

(54) METHOD FOR DETECTING GENE HAVING SPECIFIC BASE SEQUENCE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for detecting the gene having the specific base sequence, easy in automation, and capable of precisely and rapidly detecting the gene having the specific base sequence.

CONSTITUTION: The method for detecting the gene having the specific base sequence comprises immobilizing a cell containing the gene of the measurement target or a tissue slice containing the cell, connecting a region containing the gene of the measurement target in the cell to the external region of the cell, introducing a series of reaction solutions required for the multiplication of the gene having the specific base sequence due to a polymerase chain reaction containing a fluorescent nucleic acid base into a cell, adjusting the circumferential temperature of the cell to multiply the gene having the specific base sequence, washing off the fluorescent substance not used for the multiplication of the gene from the cell, and subsequently absorbing fluorescence emitted from the cell.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 23.07.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-173192

(43) 公開日 平成8年(1996)7月9日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		A 9453-4B		
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平6-335000

(22) 出願日 平成6年(1994)12月20日

(71) 出願人 000236436

浜松ホトニクス株式会社

静岡県浜松市市野町1126番地の1

(72) 発明者 細井 茂

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ
トニクス株式会社内

(72) 発明者 日吉 牧子

静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホ
トニクス株式会社内

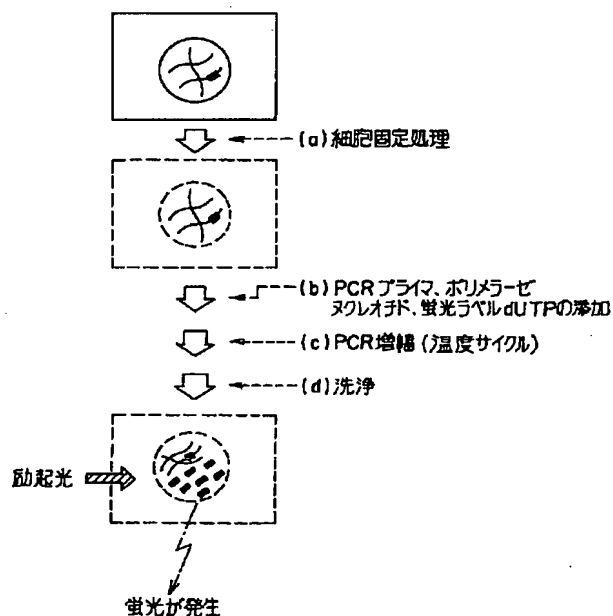
(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

(54) 【発明の名称】 特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法

(57) 【要約】

【目的】 自動化が容易であり、かつ、精度良く迅速に特定の塩基配列を有する遺伝子の検出が可能な特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法を提供する。

【構成】 本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法では、まず、測定対象の遺伝子を含む細胞もしくはその細胞を含む組織切片を固定化するとともに、細胞内の測定対象の遺伝子の存在する領域と細胞の外部領域とを連通する。次に、細胞内に蛍光性の核酸塩基を含むポリメラーゼ連鎖反応による特定の塩基配列を有する遺伝子の増幅に必要な反応液一式を導入する。引き続き、細胞の周囲温度を調節して、特定の塩基配列を有する遺伝子を選択的に細胞内で増幅する。この後、細胞から遺伝子増幅に使用されなかった蛍光物質を洗浄して排出する。次いで、細胞で発生する蛍光を観察し、細胞内の特定の塩基配列を有する遺伝子を検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 測定対象の遺伝子を有する可能性のある細胞もしくはその細胞を含む組織切片を固定化するとともに、前記細胞内の前記測定対象の遺伝子の存在する可能性のある領域と前記細胞の外部領域とを連通する第 1 の工程と、

前記測定対象の遺伝子の存在する可能性のある領域と前記細胞の外部領域とが連通された前記細胞内に、ラベル化核酸塩基を含むポリメラーゼ連鎖反応による特定の塩基配列を有する遺伝子の増幅に必要な反応液一式を導入する第 2 の工程と、

前記反応液が導入された前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片の周囲温度を調節して、前記特定の塩基配列を有する遺伝子を選択的に前記細胞内で増幅する第 3 の工程と、

選択的に増幅された前記特定の塩基配列を有する遺伝子を有する前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片から遺伝子増幅に使用されなかったラベル化核酸塩基を洗浄して排出する第 4 の工程と、

洗浄された前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片で発生するラベル化特性を観察し、前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片内の前記特定の塩基配列を有する遺伝子を検出する第 5 の工程と、
を特徴とする特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法。

【請求項 2】 前記第 1 の工程は、
前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片をガラスの表面に固着し、
前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片が固着した前記ガラスを第 1 の時間にわたって細胞固定液に浸した後
にリンスし、
固定された前記細胞をタンパク質分解酵素の溶液で第 2 の時間にわたって処理する、
ことを特徴とする請求項 1 記載の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法。

【請求項 3】 前記第 1 の工程は、
前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片の懸濁液を遠心して前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片を集め、
集められた前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片を第 3 の時間にわたって細胞固定液に浸した後
にリンスし、
固定された前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片を再度遠心して集め、
再度遠心して集められた前記細胞もしくはその細胞を含む組織切片をタンパク質分解酵素の溶液で第 4 の時間にわたって処理する、
ことを特徴とする請求項 1 記載の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法。

【請求項 4】 前記ラベル化特性は蛍光性であり、前記

第 5 の工程での蛍光観察は蛍光顕微鏡および高感度テレビカメラで行う、ことを特徴とする請求項 1 記載の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞内に存在する可能性のある、特定の塩基配列を有する遺伝子を細胞から取り出すことなく検出する、特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】細胞もしくはその細胞を含む組織切片内に特定の塩基配列を有する遺伝子（種特異遺伝子、突然変異遺伝子、ウィルス遺伝子、ガン変異遺伝子等）が存在するか否かの決定は、生物学の研究や医療診断の上で重要である。そして、顕微鏡による形態観察や、抗体染色法（ELISA 法など）を施した後に顕微鏡観察して染色状態で判断することが従来から行われてきた。また、近年では遺伝子や遺伝子を直接検出する方法の実施されているが、こうした場合には通常、細胞から遺伝子を抽出後あるいは細胞から抽出した遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法などにより遺伝子増幅した後、ゲル電気泳動にかけ、発生するバンドパターンから特定の塩基配列を有する遺伝子が存在するか否かを決定する（特開平 4-267895 号公報、特開平 5-068596 号公報など）。

【0003】一方、PCR 法の改良や進展は近年目覚ましく、細胞から遺伝子を取り出さずに細胞内（細胞核内）で遺伝子の増幅（いわゆる、in situ PCR）が報告

されている（B.K.Patterson et al., SCIENCE, 1993.3.14, vol.260, pp976-979）。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従来の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出は上記のようにして行われるので、操作が複雑であり、かつ、パターン（形態、染色状態、およびバンドパターン）の認識にあたっては人間の判断が必要となるため自動化が困難であり、精度良く迅速に特定の塩基配列を有する遺伝子の検出できない、という問題点があった。

【0005】また、ゲル電気泳動後のバンドパターンの観察に換って、遺伝子増幅を実施すると否とに拘らず、アイソトープ、蛍光物質、または発光反応に関するラベルされたプローブ（特定の遺伝子またはその一部に結合可能な物質）を結合させ、未結合のプローブを洗浄後、プローブをその特徴に従って検出する方法も提案されている。この方法を採用した場合には、測定対象である特定の遺伝子にプローブを結合させる工程が必要となる。

【0006】本発明は、上記を鑑みてなされたものであり、自動化が容易であり、かつ、精度良く迅速に特定の塩基配列を有する遺伝子の検出が可能な特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法を提供することを目的とす

る。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法は、特定の塩基配列から成る遺伝子の増幅にあたって増幅遺伝子の構成の一部をラベル化物質とし、遺伝子を構成しなかったラベル化物質を洗浄後に、ラベル化特性を測定することを特徴とする。

【0008】すなわち、本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法は、(a) 測定対象の遺伝子を含む可能性がある細胞もしくはその細胞を含む組織切片を固定化するとともに、細胞内の測定対象の遺伝子の存在する可能性のある領域と細胞の外部領域とを連通する第1の工程と、(b) 測定対象の遺伝子の存在する可能性のある領域と細胞の外部領域とが連通された細胞内に、ラベル化核酸塩基を含むポリメラーゼ連鎖反応による特定の塩基配列を有する遺伝子の増幅に必要な反応液一式を導入する第2の工程と、(c) 反応液が導入された細胞の周囲温度を調節して、特定の塩基配列を有する遺伝子を選択的に細胞内で増幅する第3の工程と、(d) 選択的に増幅された特定の塩基配列を有する遺伝子を有する細胞から遺伝子増幅に使用されなかったラベル化核酸塩基を洗浄して排出する第4の工程と、(e) 洗浄された細胞で発生するラベル化特性を観察し、細胞内の特定の塩基配列を有する遺伝子を検出する第5の工程と、を備えることを特徴とする。

【0009】ここで、第1の工程は、①細胞もしくはその細胞を含む組織切片をガラスの表面に固着し、②細胞もしくはその細胞を含む組織切片が固着したガラスを第1の時間にわたって細胞固定液に浸した後にリンスし、③固定された細胞もしくはその細胞を含む組織切片をタンパク質分解酵素の溶液で処理する、ことを特徴としてもよい。

【0010】また、第1の工程は、①細胞もしくはその細胞を含む組織切片の懸濁液を遠心して前記細胞を集め、②集められた細胞もしくはその細胞を含む組織切片を第2の時間にわたって細胞固定液に浸した後にリンスし、③固定された細胞もしくはその細胞を含む組織切片を再度遠心して集め、④再度遠心して集められた細胞もしくはその細胞を含む組織切片をタンパク質分解酵素の溶液で処理する、ことを特徴としてもよい。

【0011】また、ラベル化特性は蛍光性であり、第5の工程での蛍光観察は蛍光顕微鏡および高感度テレビカメラで行うことが好適である。

【0012】

【作用】本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法では、特定の塩基配列から成る遺伝子の増幅にあたって増幅遺伝子の構成の一部をラベル化物質とし、遺伝子を構成しなかったラベル化物質を洗浄後に、ラベル化特性を測定する。以後、ラベル化特性を蛍光性として、本発明の作用を説明する。

【0013】図1および図2は、本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法の概要工程図である。図1は特定の塩基配列を有する遺伝子が細胞内に存在しない場合であり、図2は特定の塩基配列を有する遺伝子が細胞内に存在する場合である。本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法では、まず、測定対象の遺伝子を含む細胞を固定化するとともに、細胞内の測定対象の遺伝子の存在する領域と細胞の外部領域とを連通する

(図1および図2の(a)参照)。こうした細胞の固定化には、①ガラス表面に細胞を固着し、細胞固定液に第1の時間だけ浸した後に蛋白質分解酵素で第2の時間だけ処理する方法、または、②遠心により集められた細胞を細胞固定液に第3の時間だけ浸した後に蛋白質分解酵素で第4の時間だけ処理し、再懸濁して用いるする方法がある。

【0014】次に、測定対象の遺伝子の存在する領域と細胞の外部領域とが連通された細胞内に、蛍光性の核酸塩基を含むポリメラーゼ連鎖反応による特定の塩基配列を有する遺伝子の増幅に必要な反応液一式を導入する

(図1および図2の(b)参照)。引き続き、反応液が導入された細胞の周囲温度を調節して、特定の塩基配列を有する遺伝子を選択的に細胞内で増幅する(図1および図2の(c)参照)。この後、選択的に増幅された特定の塩基配列を有する遺伝子を有する細胞から遺伝子増幅に使用されなかった蛍光物質を洗浄して排出する(図1および図2の(d)参照)。

【0015】次いで、洗浄された細胞で発生する蛍光を観察し、細胞内の特定の塩基配列を有する遺伝子を検出する。

【0016】

【実施例】以下、添付図面を参照して本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法の実施例を説明する。なお、図面の説明にあたって同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。

【0017】(第1実施例)本実施例は、測定対象の細胞をガラス表面に固着した後に、細胞内の特定の塩基配列を有する遺伝子を自動的に検出する。

【0018】図3は、本実施例の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法で使用する自動化装置の構成図である。この装置は、(a)検出動作を制御する検出制御部200と、(b)検出制御部200から出力された透過観察用のプローブ光を測定対象の細胞900へ導く光学系300と、(c)検出制御部200から出力された蛍光観察用のプローブ光を測定対象の細胞900へ導く光学系600と、(d)細胞900を保持するとともに、検出制御部200からの指示により細胞900の温度制御および観測位置の移動を行う観察ステージ400と、

(e)PCR用試料を細胞に供給する試料注入器530と、(f)細胞900の洗浄液を格納する洗浄液だめ510と、(g)観察ステージ400から排出された廃液

を格納する廃液だめ520と、(h)透過観察用のプローブ光または蛍光観察用のプローブ光の照射による細胞900の透過光像または蛍光像を撮像する高感度テレビカメラ700と、(i)高感度テレビカメラ700の撮像結果を収集して画像処理を行う画像処理器800と、(j)画像処理器800の処理結果を表示する表示装置100とを備える。そして、観察ステージ400と洗浄液だめ510とは検出制御部200からの指示により開閉する弁512およびガラス管512を介して接続され、観察ステージ400と廃液だめ520とはガラス管521を介して接続され、また、観察ステージ400と試料注入器530とはガラス管531を介して接続される。なお、光学系600は、細胞900を介した透過光または細胞900で発生した蛍光を高感度テレビカメラ700に導く光学系としても機能する。

【0019】検出制御部200は、①透過光観察用プローブ光を発生する光源210と、②弁511の開閉を指示する開閉指示器220と、③観測位置の指示をする位置指示器230と、④細胞900の温度調整を指示する温度指示器240と、⑤落射蛍光観察用プローブ光を発生する光源250と、⑥これら①～⑤を制御するとともに画像処理器800に動作指示を通知するマイクロプロセッサを備えた制御部290と、を備える。

【0020】光学系600は、①対物レンズ610と、②蛍光および細胞900の透過光を透過し、蛍光観察用プローブ光を反射するダイクロイックミラー620とを備える。

【0021】光学系300は、①透過光観察用プローブ光の進行方向を制御する偏向器310と、②透過光観察用プローブ光を集光するコンデンサレンズ320とを備える。

【0022】図4は、観察ステージ400の詳細な構成の説明図である。図2に示すように、観察ステージ400は、①位置指示器230からの指示で移動する基材プレート432と、②温度指示器240からの指示により細胞900の温度を調整する基材プレート432上に配置されたベルチェ素子入りヒートブロック420と、③ヒートブロック420上に配置された細胞900が固着されカバーガラス413と、④カバーガラス413上に*

*配置されたチャンバスベース412と、⑤チャンバスベース412上に配置されたカバーガラス411と、⑥カバーガラス411上に配置され、前述の②～⑤を固定する押えプレート431と、を備える。

【0023】本実施例では、以下のようにして、測定対象の細胞900内の特定の塩基配列を有する遺伝子を検出する。

【0024】まず、カバーガラス413単体をポリリジンで処理(カバーガラス上に500 μ g/mlのPoly-L-lysineの水溶液を数滴落とし、乾燥させる)する。

【0025】次に、採取した細胞を遠心(5000rpm, 5min)した後に、ポリリジン処理したカバーガラス413上に塗り付けて風乾し、このカバーガラス413を使用して観察ステージ400を構成する。ここで、採取細胞900を塗り付けたカバーガラス413をシャーレ内に置き、細胞懸濁液をシャーレ内に入れて細胞培養を行って観察ステージ400を構成してもよいし、この後に風乾して観察ステージ400を構成してもよい。

【0026】次いで、細胞の付着した注入器530から細胞固定液である Streck Tissue Fixative (STF) 原液をチャンバスベース412内に供給し、カバーガラス413を STF 原液中に約15分間浸した後、開閉指示器220からの指示により、洗浄液だめ510からリン酸緩衝液(PBS)をチャンバスベース412内に供給して洗浄する。なお、洗浄液には水もしくは洗剤を含む水ないし緩衝液を採用することも可能である。

【0027】引き続き、注入器530からプロテナーゼ(Proteinase K)溶液(濃度=1 μ g/ml)をチャンバスベース412内に供給し、細胞の付着したカバーガラス413を Proteinase K 溶液中に、温度調整器240からの指示により37℃で15分間の条件で浸す。この結果、細胞900の膜には細孔が形成される。この後、開閉指示器220からの指示により、洗浄液だめ510からリン酸緩衝液(PBS)をチャンバスベース412内に供給して洗浄する。

【0028】次に、注入器530から表1の組成のPCR反応液をチャンバスベース412内に供給する。

【0029】

表1 PCR反応液の組成

10×PCR バッファ	5 μ l
2.5mM 3dNTP (dATP, dCTP, dGTP)	5 μ l
250 μ M dTTP	8 μ l
250 μ M ロータミン-4-dUTP (FluoroRed)	2 μ l
25 μ M ヒト型 β -グロビン プライマ KM29	2 μ l
25 μ M ヒト型 β -グロビン プライマ KM38	2 μ l
5U/ μ l AmpliTaq DNA ポリメラーゼ	0.2 μ l
超純水 (MilliQ)	23.8 μ l
計	50.0 μ l

なお、本実施例で増幅した β -グロビン (ヒト型) 遺伝子の増幅用プライマ (KM29 および KM38) のゲノ

ム上の位置と塩基配列を図5に示す。

【0030】引き続き、温度調整器240からの指示により表2のような温度サイクルを細胞900に施してPCR法により遺伝子増幅する。

【0031】

表2 温度サイクル

94℃, 3分 (1 サイクル)

45℃, 2分 / 72℃, 3分 / 94℃, 1分 (30サイクル)

45℃, 5分 / 72℃, 7分 (1 サイクル)

なお、温度サイクルは使用するプライマや増幅する遺伝子の長さ等によって異なる。

【0032】この後、開閉指示器220からの指示により、洗浄液だめ510からリン酸緩衝液および超純水(MilliQ)をチャンバスペース412内に供給して洗浄する。

【0033】以上で、透過光観察および蛍光観察の対象の試料が準備される。そして、以下の手順で細胞900内の特定の塩基配列を有する遺伝子の観察が実施される。

【0034】まず、制御部290の指示により、光源210から透過光観察用プローブ光が出力される。透過光観察用プローブ光は光学系300を介して観察ステージ400の試料に照射される。試料に照射され、透過した光は光学系600を介して高感度テレビカメラに入力し、透過光が形成する細胞900の像が撮像される。撮像データは画像処理器800に通知され、観察位置情報とともに格納される。

【0035】次に、制御部290の指示により、光源250から蛍光用プローブ光が出力される。蛍光観察用プローブ光は光学系600を介して観察ステージ400の試料に照射される。試料に照射されて発生した蛍光した光は光学系600を介して高感度テレビカメラに入力し、蛍光像が撮像される。撮像データは画像処理器800に通知され、観察位置情報とともに格納される。

【0036】次いで、制御部290の指示により、移動制御器230から観察ステージ400へ移動指示が通知され、観察ステージ400が移動する。引き続き、上記と同様に細胞900の透過光像および蛍光像が撮像され、画像処理器800に観察位置情報とともに格納される。

【0037】更に、制御部290の指示により観察ステージ400を移動させながら、観測したい領域に関する細胞900の透過光像データおよび蛍光像データを画像処理器800に観察位置情報とともに格納する。

【0038】撮像データの収集が終了すると、画像処理器800は制御部290の指示に従って、指示された観察位置の透過光像、蛍光像、または透過光像と蛍光像との合成像を表示器100に表示する。

【0039】図6および図7は、検出結果の表示器10

0の表示を示す写真である。図6(a)および図7

(a)は蛍光像を、図6(b)および図7(b)は透過光像を示す。図6(a)および図7(a)から蛍光像で輝点が観察される。蛍光像と透過光像と重ねると、輝点の位置は細胞の中の核の位置に相当する。これは、細胞核内に多量の蛍光核酸物質の存在を意味する。つまり、細胞核内でPCRが起これ、蛍光核酸物質でラベルされたPCR産物が多量に産出されたことが確認できる。

【0040】図8は、コントロール系の検出結果であり、上記の検出工程においてPCRが起これないようにプライマを添加しないPCR反応液をした場合の検出結果である。図8(a)は蛍光像を、図8(b)は透過光像を示す。図8(a)に示されるように、蛍光像に輝点は無く、PCR反応は起きなかったことが確認できる。

【0041】(第2実施例)本実施例は、測定対象の細胞で、あらかじめ本方法により自動もしくは手で遺伝子増幅ラベル化されたものを懸濁液の状態を観察して、細胞内の特定の塩基配列を有する遺伝子を検出する。

【0042】図9は、本実施例で使用する検出装置の構成図である。図9に示すように、この装置は第1実施例と比べて、検出制御部には、開閉制御器220と温度調整器240がなく、これらの制御を行わない分だけ制御部の構成が異なるとともに、観察ステージが基材423のみから構成されることが異なる。そして、測定対象の細胞910が実装されたスライドガラスサンプル490を基材423に乗せて、検出を実行する。本実施例の検出は、測定対象の試料の作成までが第1実施例と異なる。

【0043】本実施例では、採取した細胞を培養し、細胞培養液を遠心(5000rpm, 5min)して細胞を集める。集めた細胞を細胞固定液であるSTF原液中に約15分間浸した後、再度遠心して細胞を集める。再度集められた細胞を水またはPBSで細胞を洗浄した後、プロテナーゼK溶液(濃度=1μg/ml)に37℃で15分間の条件で浸す。この後、更に遠心して細胞を集め、水またはPBSで洗浄する。

【0044】引き続き、第1実施例と同様のPCR反応液を加え、第1実施例と同様の温度サイクルを施す。この後、もう一度遠心して細胞を集め、水またはPBSで洗浄する。

【0045】次に、PBSで再懸濁して細胞懸濁液として、スライドガラス上にのせ、カバーガラスを被せて測定試料490とする。

【0046】以後、第1実施例と同様にして、透過光像と蛍光像とを収集し、表示する。本実施例においても第1実施例と同様の結果を得る。

【0047】本発明は、上記の実施例に限定されるものではなく変形が可能である。例えば、上記の実施例ではラベル化核酸塩基として蛍光性核酸塩基としたが、放射性同位元素を含む核酸塩基や発光性もしくは吸光性核酸

塩基を使用することも可能である。なお、こうした場合には、ラベル化特性を検出することになるので、ラベル化特性に応じた検出器を使用する必要がある。また、本実施例ではヒトのβ-グロビン遺伝子増幅用プライマを用いてヒト特異的遺伝子を検出したが、本方法は疾患原因となる突然変異遺伝子、病因ウィルス特異的遺伝子、ガンにより変異を起こした遺伝子等のプライマを用いることによりそれらの存在を検出することが可能である。

【0048】

【発明の効果】以上、詳細に説明した通り、本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法によれば、特定の塩基配列を有する遺伝子を増幅するとともに、増幅遺伝子にラベル化した核酸塩基を取り込ませることとしたので、自動化可能であり、かつ、精度良く迅速に細胞内の特定の塩基配列を有する遺伝子を検出することができる。

【0049】

【配列表】

配列番号 : 1 (KM29)

配列の長さ : 22

配列の型 : ヌクレオチド

鎖の数 : 一重鎖

トポロジー : 線状

配列

GGTTGGCCAA TCTACTCCCA GG

配列番号 : 2 (KM38)

配列の長さ : 22

配列の型 : ヌクレオチド

* 鎖の数 : 一重鎖

トポロジー : 線状

配列

TGGTCTCCTT AAACCTGTCT TG

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法の概要説明図である。

【図2】本発明の特定の塩基配列を有する遺伝子の検出方法の概要説明図である。

10 【図3】本発明の第1実施例で使用する検出装置の構成図である。

【図4】図3の検出装置の観察ステージの詳細構成図である。

【図5】β-グロビン（ヒト型）プライマの位置と配列との説明図である。

【図6】実施例での細胞（生物の形態）の検出結果を示す顕微鏡写真である。

【図7】実施例での細胞（生物の形態）の検出結果を示す顕微鏡写真である。

20 【図8】コントロール系での細胞（生物の形態）に関する検出結果を示す顕微鏡写真である。

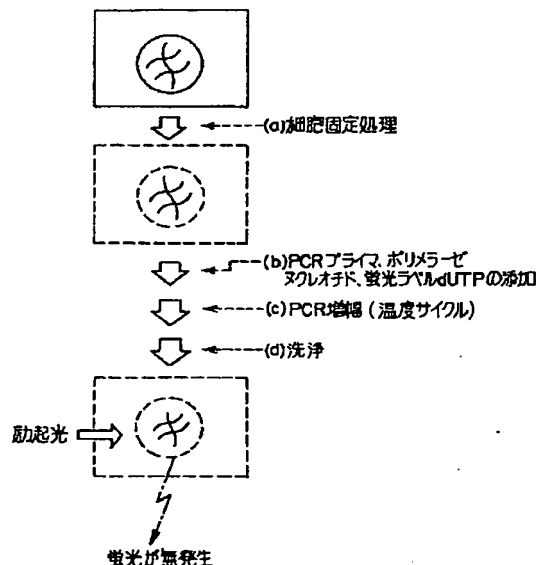
【図9】本発明の第2実施例で使用する検出装置の構成図である。

【符号の説明】

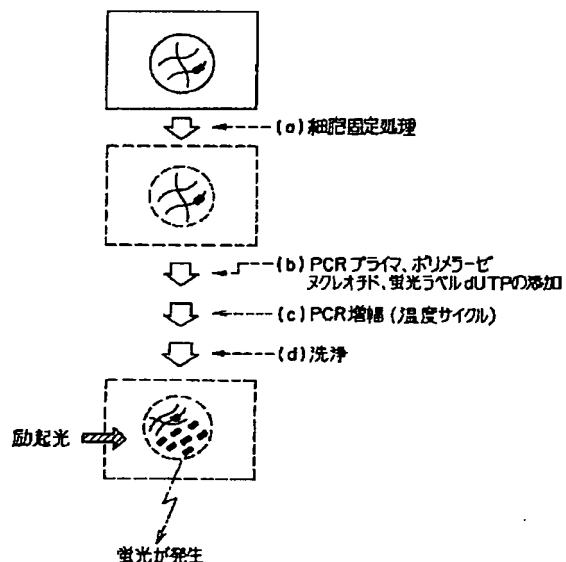
100…表示器、200、260…検出制御部、300、600…光学系、400…観察ステージ、510…洗浄液ため、520…廃液ため、530…注入器、700…高感度テレビカメラ、800…画像処理器、900、910…測定対象細胞。

*

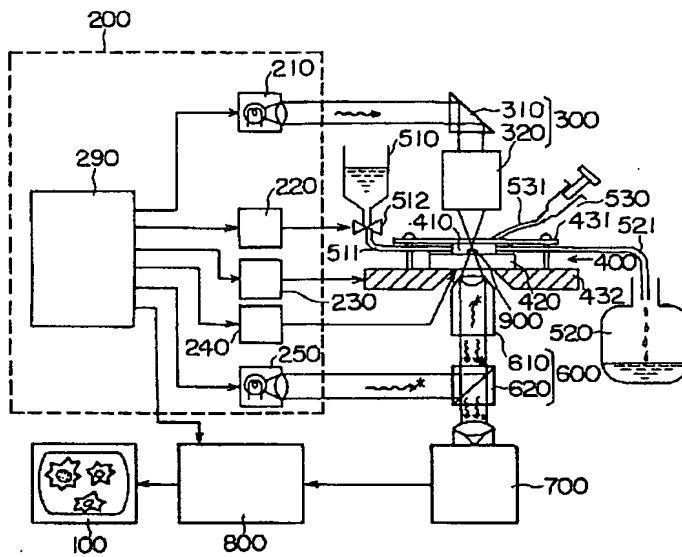
【図1】



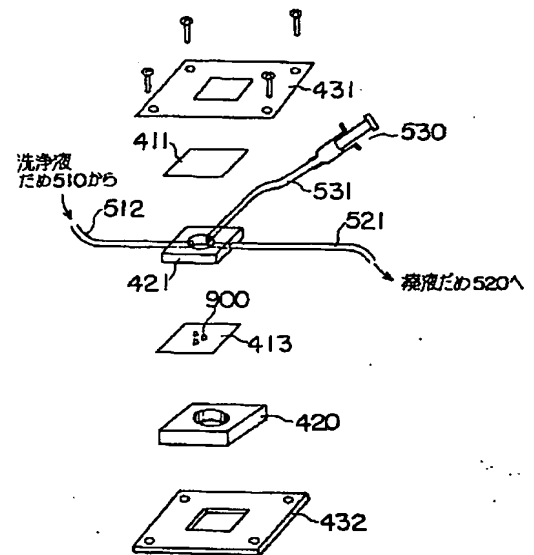
【図2】



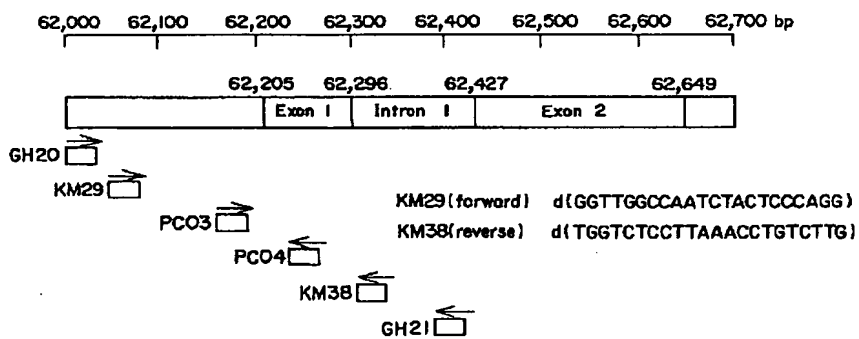
【図3】



【図4】



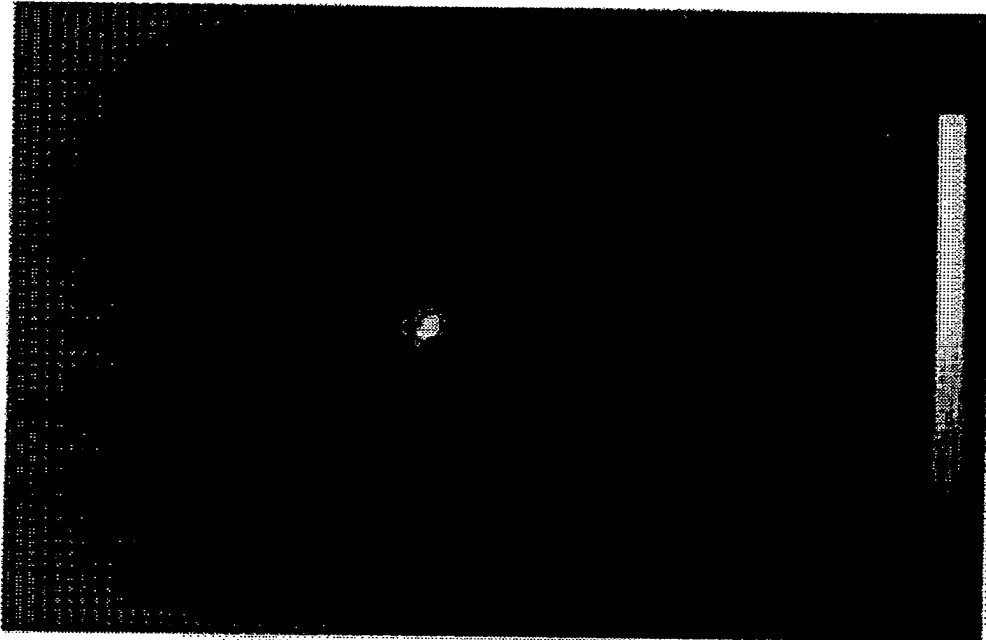
【図5】



【図6】

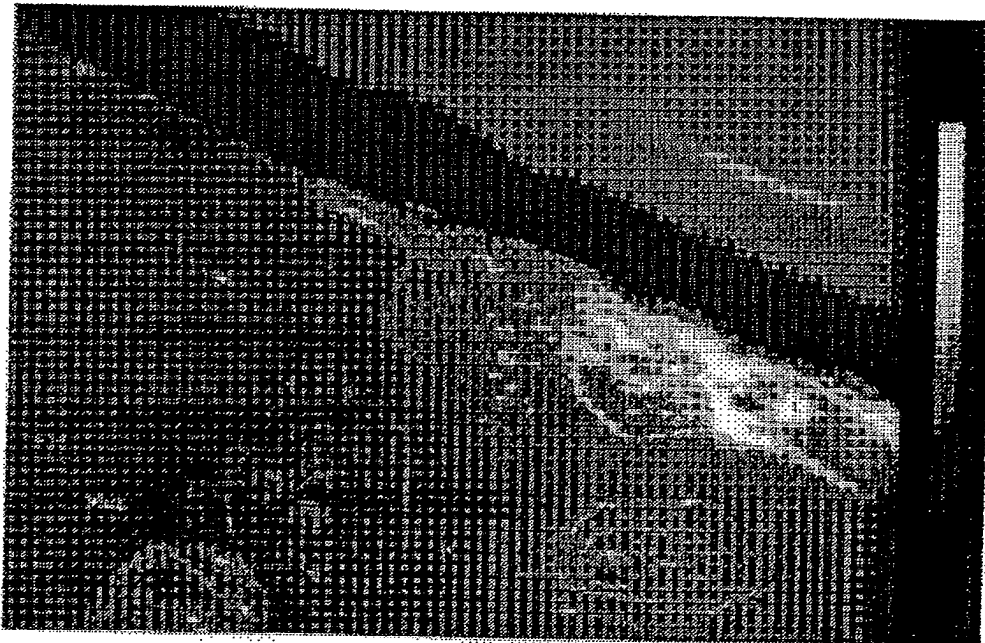
(a) 蛍光像

透過像用写真



写真

(b) 透過像

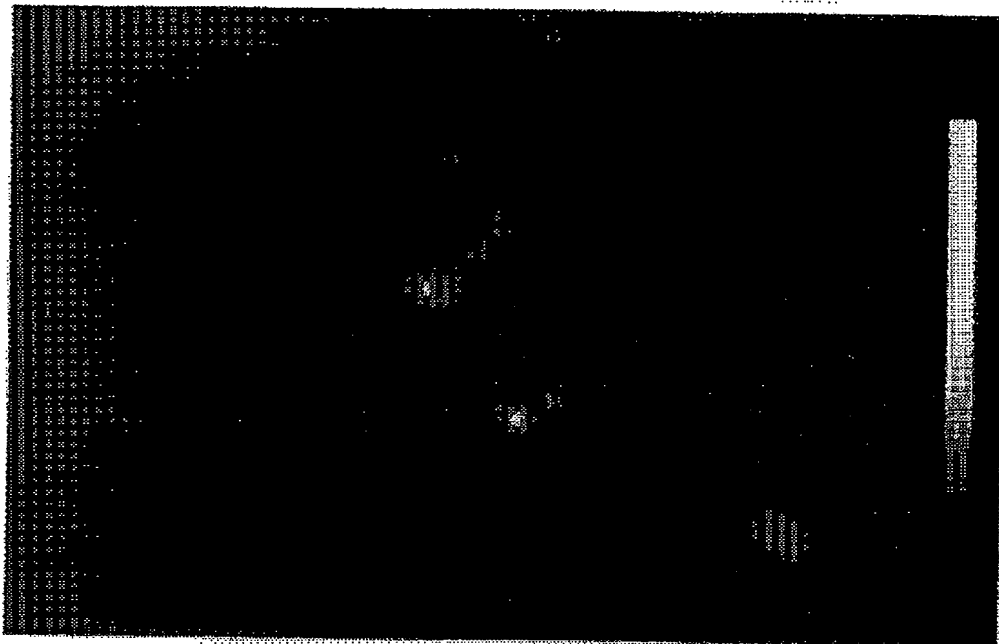


写真

【図7】

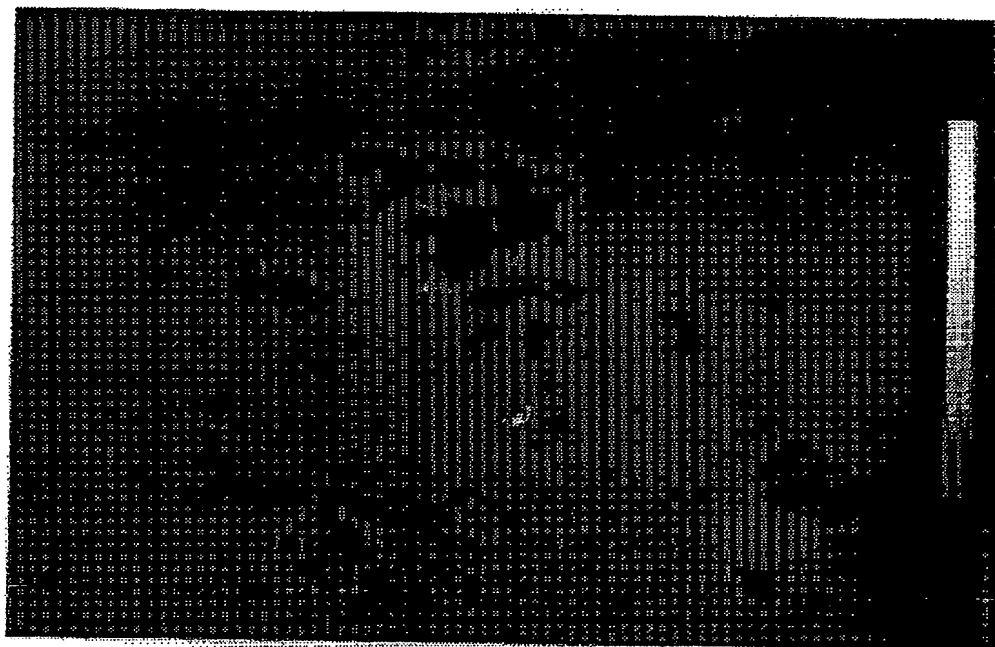
(a) 蛍光像

図面代用写真



写真

(b) 透過像

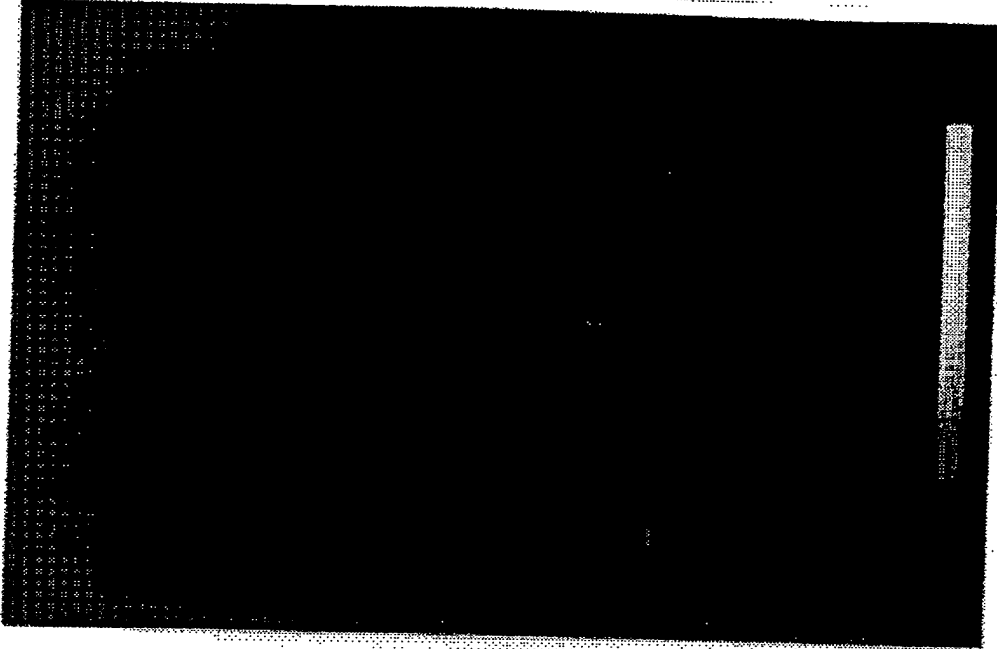


写真

【図8】

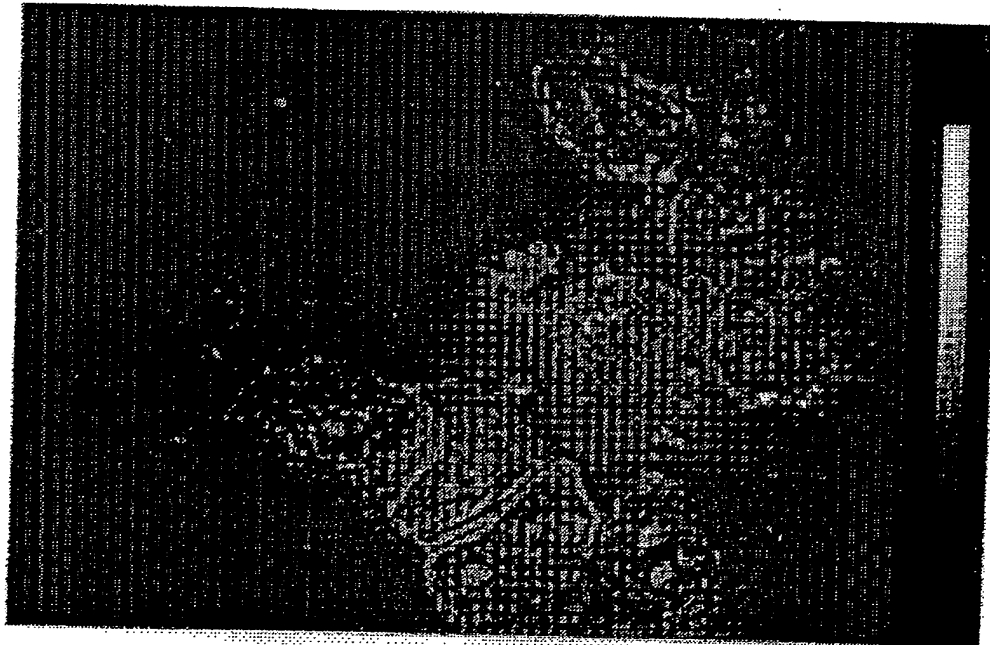
(a) 蛍光像

図面代用写真



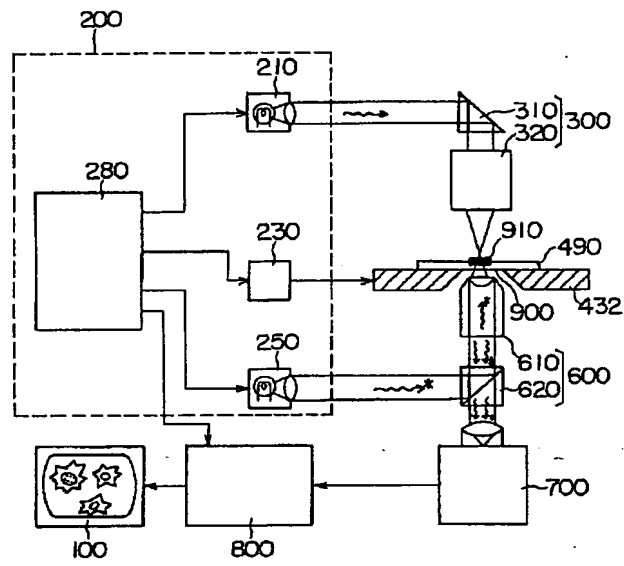
写 真

(b) 透過像



写 真

【図 9】



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)